中藥植物利用組織培養進行大量繁殖及生產藥用成分之技術

林郁進[(1)]、陳忠川[(1)]、葉豐次[(1)]
張永勳[(1)]、謝明村[(1)]、蔡新聲[(2)]
(1)中國醫藥學院中國藥學研究所
(2)臺灣省農業試驗所農藝系

一、摘要

當歸、黨參、半夏、金線連、地黃、沙參、貝母、白及、白芷、柴胡、何首烏、草烏、虎杖及桔梗等重要中藥，數千年來早已被國人廣泛的應用於治療民間多種疾病之藥材；雖然上述部份中藥在國內屬原產，但因中藥市場的需求相當大，且經年年大量採摘，目前已有多種瀕臨絕種。本文敘述利用組織培養大量繁殖上述稀有中藥及恆春薯蕷、白芷以癒合組織或懸浮細胞培養生產二次代謝物，以提煉中藥成分之方法，俾有利於國內中藥之開發。

關鍵字：中藥植物、組織培養、大量繁殖、藥用成分。

二、前言

當歸、沙參、黨參、草烏、何首烏、白及、白芷、貝母、柴胡、地黃及桔梗等重要中藥，由於具有滋陰、補血、清熱、涼血、鎮痛、鎮靜、消炎、降血糖利尿、緩下及抗凝血等作用，數千年來已被國人廣泛的應用於治療民間各種疾病之方劑，因此生藥市場的需求相當大。雖然上述部份中藥在國內屬原產，但因年年大量採摘，目前有多種已瀕臨絕種，有鑑於此，台灣省農業試驗所乃與中國醫藥學院中國藥學研究所合作進行中藥植物組織培養之研究，其目的在發展利用組織培養技術大量繁殖上述名貴中藥之方法，以挽救名貴中藥瀕臨滅種之危機，同時嚐試發展以懸浮細胞培養生產二次代謝物，以提煉中藥成份之技術，所得結果應可供製藥工業之用。

三、中藥利用組織培養之大量繁殖技術

歐、美、日等先進國，對中藥組織培養大量繁殖之研究已有二十餘年歷史，目前高貴藥材之大量繁殖，已成功的報告有柴胡(Tsukaba, 1983; Hiraoka et al.,1983; Amano et al.,1989)、紫草 (Maeda et al., 1983; Tsukaba, 1983)、竹節人參 (Fujioka et al., 1986; Shoyama et al., 1987)、毛麝香百合 (Shoyama et al., 1987)、貝母 (Shoyama et al., 1986)、茅蒼朮 (Hiraoka et al., 1984 ; Shoyama et al., 1987)、芍藥 (Yamamoto et al., 1985)、當藥 (Kitamura et al., 1987)、大黃 (Kaneko et al., 1986)、防風 (Hiraoko et al., 1987)、黃耆 (Fujioka et al., 1983)、半夏 (Shoyama et al., 1983; Hatano et al., 1986; Nishioka, 1988; Tsay et al., 1989)、地黃 (Matsumoto et al., 1986; Nishioka, 1988; Xu and Davey, 1983)、毛地黃 (Erdei et al., 1981)、百脈根 (Ahuja et al., 1983)、山藥 (Forsyth and staden, 1982)、人參 (Chang and Hsing, 1979; 1980) 與白及 (Ichihashi and Yamashita, 1977; Luks and Shevehenk, 1977; Ichihashi, 1978;

1979; 1982; Jonsson and Nylund, 1979; Chung et al., 1983; Nair et al., 1986; Masuhara and Katsuya, 1989; Nagashima, 1982) 等。筆者研究室約在十年前開始著手進行中藥的組織培養研究，目前成功的有半夏、金線蓮、地黃、桔梗、沙參、黨參、貝母、白及、白芷、柴胡、何首烏、草烏、虎杖及當歸，以下謹提供部分研究心得供各位先進參考指正。

㈠半夏（ Pinellia ternata ）株芽培養之大量繁殖

雖然半夏的根、莖、葉、種子、株芽等營養体經培養後均具有形成芽球相似体（ protocorm-like body, PLB ）的能力，但PLB形成的數目則以株芽爲材料最爲有利。其法爲將採自武陵農場之半夏株芽（約2～4 mm大小），先以70 ％酒精消毒30 sec後，以0.5 ％ NaClO消毒滅菌10 min，再以無菌水清洗3～4次後，接種於含有3 ％ sucrose,2 mg/l BA, 0.2 mg/l NAA及1 ％ agar之MS（ Murashige and skoog, 1962 ）基本培養基，於每日照光16hr、1,500 lux光強,26 ± 1 ℃環境下進行培養，10天後可見株芽外緣裂開由內部形成PLB，經30天培養後PLB可急速增生，將PLB繼代培養於含有2 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA及0.2 mg/l 2,4-D之液体MS基本培養基，可使PLB以每20天增大30～40倍之速度增生，若將液体培養基中之2,4-D去除，則可誘導PLB形成芽体（圖1），若將PLB繼代培養於含有2～5 mg/l BA之MS固体培養基，則平均1cm3之PLB可形成約70個新芽，達到大量繁殖的目的（圖2）。估計，一個半夏珠芽一年以後約可獲得約1.7 × 1027個植株。大量繁殖之芽体繼代培養於含有3～5 ％ sucrose, 1 mg/l NAA之1/2 MS 基本鹽類培養基，發根率可達100 ％，移植於1蛭石：2壤土：1腐植土之介質上，成活率可達96 ％（陳等, 1989；Tsay,et al., 1989）。

㈡金線連（ Anoectochillus formosanus ）生長點及莖節培養之大量繁殖

山野間採回之野生金線連，先取其莖頂培養以建立無菌株，再將此無菌株切成各含一個莖節之培殖体，接種於含有0.3mg/l NAA, 170mg/l NaH2PO4, 40mg/l adenine sulfate, 0.3 ％ charcoal, 3 ％ sucrose, 0.8 ％ agar及3～5 mg/l BA之1/2 MS基本鹽類培養基，於每日照光16 hr、1,500 lux光強、26 ± 1 ℃環境下進行培養，約2個月後每個莖節約可形成7～8個芽体；若將莖節先培養於如上述成份之液体培養基，以100 rpm速度及500 lux光強度下行振盪培養，約一個月後莖節可形成多量芽体，此液体振盪培養一個月後之小芽，經移植於固体培養基後，其衍生側芽之速度及數量均較原只用固体培養基者爲佳，且植株產生較多根毛及生長勢亦較旺盛(圖3)。這些具正常根系之健康瓶苗，約經2個月生長後(圖4)，即可移植到適宜之環境及栽培介質中假植及定植，成活率可達95 ％以上（劉等, 1987a；1987b；蔡, 1994）。

㈢地黃（ Rehmannia glutinosa ）、桔梗（ Platycodon grandiflorum ）之莖頂培養大量繁殖

地黃、桔梗二種中藥組織培養之大量繁殖，在許多受測培殖体中均以莖頂最佳，使用之培養基亦和半夏及金線連大同小異，一般以1/2 MS配合1～2 mg/l BA及0.5 mg/l NAA（桔梗）或不含NAA（地黃）爲佳，試管苗之發根則以含有1 mg/l NAA, 3 ％ sucrose之1/2 MS基本鹽類爲佳（圖5, 6）（張, 1988；沈, 1988）。

㈣輪葉沙參（ Adenophora triphylla ）及黨參(Codonopsis radix)之莖段培養大量繁殖

輪葉沙參不同培殖体誘導不定芽形成的能力以幼嫩莖段最強，側芽次之，而以葉片最差。

於含有2 mg/l BA及0.1 mg/l NAA之MS基本鹽類培養基，可誘導莖段形成最多的芽体（圖7），誘導這些不定芽形成二次不定芽之能力以含有4 mg/l BA之MS培養基最佳，且繼代培養後20天內產生不定芽之能力最強。以固体培養誘導莖段來源不定芽行成二次不定芽，經20天之培養可得6倍之不定芽而液体培養則可得20倍二次不定芽。唯因液体培養之光線較弱（1500 lux vs 500 lux），因此產生之芽体較爲瘦弱細長，所以採用將不定芽置於液体培養基快速繁殖，再將不定芽之生長移至固体培養基之改良法較佳。將不定芽培養於含有5 % sucrose, 1 mg/l NAA及1/4MS基本鹽類之固体培養基，培養基部份以鋁箔遮光之處理可得最佳之根系，移植於含有蛭石、壤土及腐植土之栽培介質成活率可達96 %以上（陳, 1991）。

黨參利用組織培養大量繁殖之方法，發現以黨參之葉、莖段、節、及莖頂爲不同來源之培植體誘導不定芽之形成，以接近莖頂部份之莖段最好、莖頂次之，再其次爲節，而以葉部最差。以莖段爲培植體則以距離莖頂5 cm以內之莖段，誘導不定芽能力最高，0.5 cm之莖段平均可獲得11個不定芽（圖8），其次爲距莖頂5.1～10 cm者，而以距莖頂10.1～20 cm者較差；莖段誘導不定芽的產生，以含0.1 mg/l NAA及2-4 mg/l BA 之MS培養基較佳。誘導不定芽之發根則以含有1～2 mg/l NAA，5 % Sucrose，及1/4 MS 基本鹽類的培養基最好。將含有良好根系之試管苗移植於含有1/3腐質土之壤土，或壤土：蛭石：腐質土＝2：1：1之介質中，成活率均可達100 %（張及蔡, 1995）。

㈤三島柴胡台農一號（Bapleurum falcatum L. cv. Tainung No.1）之大量繁殖

三島柴胡台農一號利用頂芽之繁殖效果較腋芽爲優，含有1～2 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA, 1 % sucrose及0.9 % agar之1/4 MS基本鹽類培養基，可促進由頂芽誘生之幼苗体在試管中生長，其成活率可達100 %。將成活芽体繼代培養於液体培養基中之繁殖率高於固体培養基，於含1 mg/l BA之MS液体培養基下培養一個月，可得13倍之繁殖率（圖9）（許等, 1993）。

㈥台灣白及（Bletilla formosana）種子之無菌播種

台灣白及係台灣固有蘭科白及屬多年生草本植物，以往繁殖法均依賴分芽法，速度極爲緩慢，無法有效大量的生產以供藥用。用傳統法之種子播種亦如蘭花無法發芽，因此以人工培養基誘導白及種子萌芽，是首須解決之問題。試驗結果顯示各種成熟度之果莢，以發育至魚雷期之種子萌芽率最佳，且小苗生育較快速，此種子以3 %雙氧水預措處理5min及2,000 lux光照，有助提高萌芽率及促進小苗生長。添加MS基本鹽類及sucrose可幫助種子所形成的芽球早日發育爲小苗，peptone及植物生長調節劑可促進小苗發育，尤以NAA的效果最爲顯著。最佳之發芽培養基爲半量至全量MS基本鹽類添加3 % sucrose, 2～4g/l peptone, 3mg/l BA, 0.2mg/l NAA 及0.8 % agar之培養基，其萌芽率幾達100 %。挑選發芽良好、生長健壯之芽体，繼代培養於含有2mg/l BA之MS培養基，可達到大量繁殖優良芽体之目的（圖10）（林等,1994；葉等, 1995）。

㈦其餘中藥之大量繁殖

除上述中藥已可成功的利用組織培養大量繁殖外，目前進行中之中藥組織培養大量繁殖有當歸、貝母、虎杖、何首烏、初步之試驗結果均已証實利用莖頂、芽体、或未成熟胚均可達到

大量繁殖之目的（圖11～14），其詳細過程之研發則尚需假以時日。

四、中藥利用細胞懸浮培養生產二次代謝物

二次代謝物（又稱次級代謝物）乃指化學結構複雜，非全部植物體或植物細胞均具有，由特殊遺傳形質控制，其合成與細胞之分化有關，對合成之細胞本身而言缺乏重要性之細胞代謝物如固醇、生物鹼、帖類、抗生素、色素等。相對於二次代謝物則有一次代謝物（又稱初級代謝物），乃指對植物體生長、存活不可或缺，植物體所共有，如碳水化合物、脂肪、氨基酸、蛋白質、核酸等。利用組織或細胞培養法大量生產工業用或醫藥用的有機代謝物，特別是二次代謝物是最近十分熱門的話題。植物體本身具有很強的生合成能力，其所合成的化合物種類之多、範圍之廣，可能是其他生物無法相比的。目前已知的天然化合物有30,000多種，其中80%以上是來自於植物，可見高等植物在合成天然物質中所扮演的重要角色。而植物組織和細胞培養不受環境因素如氣候、季節、土壤和病蟲害的影響，能在地球上任何地方與任何時候進行，培養物及生產的物質整齊一致；任何新發現的植物種類都能立即著手培養，能縮短繁殖和引種栽培的時間；同時還可以人工控制防止有毒藥物的擴散和濫用；尤其重要的是植物細胞培養可以工廠化生產而不與農業爭地，培養細胞生長迅速，週期短，能夠在人工控制條件下，採用科學方法提高產量和品質（蘇等, 1990）。

促使植物細胞培養生產二次代謝物，可從(A)選擇植物激素；(B)培養液的組成；(C)化學應力--誘引物質的添加；(D)物理應力及(E)分化培養等方法著手。生產二次代謝物的培養基，其組成分必須做不同的調配，改變無機物、有機物之組成，塡加不同的碳水化合物或植物生長調節劑是細胞及組織培養中必要的工作。例如日本三井石化工業生產奈琨之培養基以不含NH4之M-9培養基為主，而以IAA配合Kinetin之植物生長調節劑，則又比使用2,4-D及Kinetin者，奈琨的產量多了十幾倍；如何維持培養其中pH值的穩定亦不容忽略。除了培養基成份外，環境條件也是影響細胞生長的重要因子，如光強度及波長與花青素形成有關。另外，振盪的速度、培養瓶內氣體成份及溫度均影響二次代謝物的生成。此外可利用不同的誘導因子激發或增加細胞生產代謝物。添加前驅物(precursor)於培養基內是目前常用的手段，而利用培養細胞的轉換能力進行生物轉換(biotransformation)係最近新發展的技術，對於大規模生產二次代謝物有莫大的幫助。如培養的毛地黃((foxglove, *Digitalis lanata*)細胞可提供β-12-hydroxylation的條件，而將毛地黃毒甘(digitoxin)轉換成毛地黃素(digoxin)，成為治療心臟病的名貴藥材，使這些昂貴的化合物能大量生產。篩選優良細胞株及尋求變異株也是生產二級代謝物的另一途徑（蘇等,1990）。促使細胞分化是導致細胞正常產生二次代謝物的另一有效方法，例如利用微生物植入(microbial insert)的方法，將土壤微生物 *Agrobacterium rhizogenes* 中具有誘發被感染植物或細胞產生大量鬚根(hairy root)之基因，植入培植體或細胞中，以生產人參之主要藥用成份Gensenoside, 已被日本工業界廣泛應用（Yoshikawa and Furuya, 1987）；利用根系生產二次代謝物之文獻極多，其產物以菸鹼(nicotine)及植物鹼為主（Bajaj, 1988；1989；1991；Komamine et al., 1991；Yamada and Fujita, 1983）。

經由植物細胞培養生產的物質包括植物鹼、碳水化合物、心臟藥劑、酵素、殺蟲劑、荷爾蒙、色素及香味成份，茲舉下幾列略述其生產過程及方法：

㈠Shikonin（奈琨）

奈琨及其衍生物存在於紫草 (Lithospermum erythrorhizon) 的根部中。在日本是一種傳統藥劑，具有抗菌、抗炎的效果。通常用來治療燒傷和痔瘡，由於帶有鮮紅色亦可作為染料。由於紫草植株長到5-7 年後，奈琨的含量才只有1-2%，僅靠日本國內栽培無法滿足需求，還要大量進口。奈琨的價格每公斤約在4,500 美元，因此，三井石油化學公司選此植物為材料進行生產奈琨之研究。三井石油化學公司的研究人員應用 Lismaier & Skoog 和 White 培養基，找出適於細胞生長的 MG-5 培養基和適於生產奈琨的 MG-9 培養基，也就是所謂的兩階段培養 (two-staged culture)。其效果可使奈琨的含量增加十幾倍。再經由細胞質的篩選獲得了高產的 M18 細胞系使得最後每克細胞（鮮重）得到 1,000 ug 的產量，得以大規模工業化生產。

㈡Taxol（紅豆杉醇）

Taxol 是最近幾年才被從紅豆杉 (Taxus brevifolia) 樹皮提煉出之癌症特效藥，臨床上已證明對乳癌及卵巢癌具奇特的效果，但治療一個病人所需之 taxol 需要 2-3 株 60 年生之紅豆杉，這對已瀕臨絕種的紅豆杉勿寧是一項浩劫，因此美國政府立法以限制人類肆無忌憚的大量砍伐；又從紅豆杉樹皮提煉及純化 taxol 的複雜過程及手續，限制了這種藥物的利用價值。採用細胞培養大量生產，既不因大量砍伐樹木而破壞生態，由懸浮細胞純化 taxol 之過程又十分簡單是最佳手段。美國農部所主持的研究計畫中，已可使1公升的細胞懸浮液生產出 1mg 以上的 taxol，這對傳統從 2,000-4,000 株 60 年生老樹才可抽取 1kg taxol 的老方法而言，是一項振奮人心的成就，未來以懸浮細胞工業化大量出產 taxol 以造福癌症患者，應是指日可待之多 (Komanine et al., 1991)。

㈢Saffron

Saffron 是利用番紅花 (Crocus sativus) 柱頭所製成之自然食品色素及調味料，由於每株番紅花每年只開一次花且只有一朵花，因此 Saffron 的價格貴達每公斤 2,000 美元，可算得上是世界上最貴重的食品調味料之一。Saffron 中所含之主要成份包括 crocin 及 crocetin 二種色素及 picrocrocin 的苦味和 saffranal 的香氣。印度中央食品科技研究所的研究人員報導，番紅花的花蕾培養所誘導出之癒合組織及花絲狀結構，可生產上述 Saffron 中之各種成份；紅色球狀癒合組織所生產之 Saffranal 和花朵上採收柱頭之含量相同；而花絲狀結構所含 picrocrocin 之量更可高出柱頭之含量 5-6 倍之多 (Namera et al., 1987)。

以組織培養技術生產二次代謝產物成功的報告，其它如黃芩 (Scutellaria beicalensis) 利用癒合組織生產 baicalin, baialein 及 wogonin (Yamamoto et al., 1986a; 1986b; 1987)、山梔子利用懸浮細胞生產 crocin (Namara et al., 1988)、芍藥 (Paeonia lactiflora) 利用根培養生產 paeoniflorin 及 albiflorin (Yamamoto et al., 1985) 及龍葵 (Solanum eleagnifolium) 利用癒合組織生產 Solasonine 及 Solamargine (Chandler and Dodds, 1986; Nigra et al., 1989) 等。農試所和中國醫藥學院中國藥學研究所的合作計畫，亦已針對白芷及山藥兩種中藥，進行利用癒合組織或利用懸浮細胞生產主要中藥成份之研究，初步結果如下：

㈠恆春薯蕷(Dioscorea doryophora)利用癒合組織及懸浮細胞生產diosgenin

恆春薯蕷含有diosgenin之成份，以diosgenin爲架構，可合成許多醫療用的類固醇(medicinal steroids)，是合成醫用類固醇最快速且良好的材料。藉由組織培養癒合組織的誘導及所建立之懸浮細胞，發現由零餘子所誘導的癒合組織含diosgenin 量最多可達3.3 %，而零餘子癒合組織所建立之懸浮細胞則含3.2 % diosgenin之量，幾和恆春薯蕷栽培品之擔根体含有3.5 % diosgenin相當，極有開發爲商品之價值。而其他部份培殖体所誘導的癒合組織或懸浮細胞則含量甚低，較不具開發意義(黃等,1993；葉等,1994)。

㈡台灣白芷(Angelica dahurica)利用懸浮細胞生產中藥成份imperatorin

台灣白芷最早收載神農本草經中品，爲治風要藥，對頭痛尤其有效。近來白芷更應用於銀屑病的治療，效果良好，究其主要化學成份中，以imperatorin爲治療銀屑病的有效成份之一。台灣白芷之幼嫩葉柄經以含1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, 0.9 % agar及3 % sucrose之MS培養基培養，可誘導出質地較硬、色白微黃之癒合組織，再以不含agar之液体培養基行120 rpm之振盪培養，可建立一分散均勻，生長良好之懸浮細胞(圖15)，經由TLC及HPLC檢測，台灣白芷之癒合組織及懸浮細胞均含有imperatorin及byak-angelicin；利用有臂三角瓶(De-Long flask)測定懸浮細胞生長條件及培養基(圖16)，發現添加20 g/l XAD-7之誘引劑(elicitor)對imperatorin之形成幫助最大，可使imperatorin的產量提高140倍之多，未來大量生產則需採用〝二階段培養〞的方式進行，即第一階段大量培養白芷懸浮細胞，第二階段再利用elicitor誘引使imperatorin大量形成，以萃取此有效成份，如此可縮短植物生長時間，提供一有效且經濟的製藥途徑(張等,1993；陳等,1994；Tsay et al., 1994)。

五、結論

中國人使用傳統中藥已有數千年的歷史，中藥可治病應是無庸置疑之事。百年來由於國力衰退及西方文化的入侵，影響所及竟把老祖宗賜給我們的寶物－〝傳統中藥〞遺忘怠盡。最近許多報告指出中藥對二十一世紀的黑死病－AIDS，及許多類型的癌症具有極佳的療效，因此興起了歐、美、日等先進國研究中藥之熱潮，中國傳統中藥草竟反由西方人士主導，能讓我們不感到汗顏乎？佔有天時、地利、人和諸多有利條件的我們，實應急起直追，迎頭趕上。組織培養技術不但可將瀕臨絕種的中藥起死回生大量繁殖，以應日後殷切的需求(例如金線連的大量繁殖供應中藥市場)，而且可藉細胞懸浮培養技術工業化大量生產人類有用的中藥成分(二次代謝物)，實一舉數得，值得政府有關部門大力讚助及推展。

植物細胞具有很大的生合成甚至產生新物質的能力，目前才只是它的起步階段而已，若能配合生物技術的快速發展，使得生產二次代謝物的成本降低，植物細胞培養將益受重視；一般預料，將來會有許多更高價的化合物利用此一技術以企業化生產。利用懸浮細胞生產人類有用之二次代謝物，在培養技術及細胞株的選擇方面尚須加強，這方面的研究，值得有興趣專家學者共襄盛舉。

六、致謝

感謝國科會及台灣省政府多年來支持研究經費。

七、參考文獻

沈月清。1988。桔梗試管內組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中市，台灣。

林郁進、陳忠川、葉豐次、邱年永、蔡新聲。1994。台灣白及之組織培養Ⅰ.種子成熟度及前處理對種子萌芽與小苗發育之影響。中華農業研究 43:40-50。

張文德、陳忠川、張永勳、蔡新聲。1993。台灣白芷組織培養之研究 Ⅰ.癒合組織之誘導及培養基成份之探討。中華農業研究 42:253-264。

張平順、蔡新聲。1995。黨參利用組織培養之大量繁殖。中華農藝(審稿中)。

張東迪。1988。地黃試管內組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中市，台灣。

許家言、劉新裕、蔡新聲。1993。三島柴胡台農一號之組織培養。中華農業研究 42：245-252。

陳忠川、高宗桂、蔡新聲。1989。半夏癒合組織的誘導及植物体分化之研究。中華農業研究 28：30-41。

陳忠川、張文德、張永勳、蔡新聲。1994。台灣白芷組織培養之研究 II. 細胞懸浮培養之建立及培養條件之探討。中醫藥雜誌 5:123-134。

陳素昭。1991。輪葉沙參組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中市，台灣。

黃雯雯、陳忠川、葉豐次、蔡新聲。1993。恒春薯蕷之組織培養 I. 探討不同來源培植體中國醫藥學院雜誌。中國醫藥學院雜誌 2:151-160

葉豐次、陳忠川、黃雯雯、那琦、蔡新聲。1994。恆春薯蕷之組織培養 II. 細胞懸浮培養之建立及 Diosgenin 含量之測定。中華農藝 4:257-268。

葉豐次、林郁進、陳忠川、邱永年、蔡新聲。1995。臺灣白及之組織培養 II. 培養基之組成分對種子萌芽與小苗發育之影響。中華農藝（審稿中）。

劉新裕、蔡新聲、徐原田、劉柏煙。1987a。金線連之繁殖與栽培技術。科學農業 35：125-129。

劉新裕、蔡新聲、黃漢津、胡敏夫、葉常青。1987b。金線連大量繁殖與栽培後之生育情況、種間比較及營養成份研究。中華農業研究。36：357-366。

蔡新聲。1994。設施盆花及觀葉植物的組織培養技術。興農306：8-15。

戴宗德。1992。湖北貝母組織培養之研究。中國醫藥學院中國藥學研究所碩士論文，台中市，台灣。

蘇遠志、楊瑞森、高建元。1990。利用植物細胞培養生產二次代謝產物。生物產業1:1-14。

Ahuja, P. S., S. Hadiuzzaman, M. R. Davey and E. C. Cocking. 1983. Peolific plant regeneration from protoplast-derived tissues of Lotus corniculatus L. Plant cell Reports 2:101-104

Bajaj, Y. P. S. 1988. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants I. Springer-Verlag, New York. pp. 1-550.

Bajaj, Y. P. S. 1989. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 7. Medicinal and Aromatic Plants II. Springer-Verlag, New York. pp. 1-545

Chandler, S. and J. Dodds. 1986. Solassodine production in rapidly proliferating tissue cultures of Solanum laciniatum aits. Plant cell Reports 2:69-72.

Chang, W. C. and Y. I. Hsing. 1979. Suspension culture of root callus of Panax ginseng C. A. Mayer. Nat. Sci. 7(2):147-155.

Chang, W. C. and Y. I. Hsing. 1980. In Vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (Penax ginseng). Nature 284:341-342

Chung, J. D., C. K. Chun and J. H. Suh. 1983. Asymbiotic germination of seeds of Bletilla striata. II . Effect of sucrose and agar concentration and pH value on seedling growth. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 24:243-248.

Erdei, I., Z. Kiss and P. Maliga. 1981. Rapid clonal multiplication of Digitalis lanata in tissue culture. Plant Cell Reports 1:34-35

Forsyth, C. and J. V. Staden. 1982. An improved method of in vitro propagation of Dioscorea bulbifera. Plant Cell Tissue Organ Cuture 1:275-281.

Fujioka, N., K. Nakao, Y. Fujiota, H. Miyagawa, H. Kohda, K. Yamasaki and S. Takami. 1983. The production of plant regenerated from shoot tips of Astragalus membranaceae B. The Japanese Journal of Pharmacognosy 37:405-411.

Fujioka, N., Y. Kurisu, H. Miyagawa, H. Kohda, K. Yamasaki, Y. Shoyama and I. Nishioka. 1986. Studies on the tissue culture of Panax japonicus(1)Multiplication by somatic embryogenesis of flower bud and rhizome. The Japanese Journal of Pharma-

cognosy 40:152-158.

Fujioka, Y., Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto, 1981a. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of Lithospermum erythrorhizon. Plant Cell Reports 1:59-60.

Fujioka, Y., Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto, 1981b. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of Lithospermum erythrorhizon. Plant Cell Reports 1:61-63.

Hatano, K., Y. Shoyama and I. Nishioka. 1986. Multiplication of Pinella ternata by callus culture of leaf segment. The Japanese Journal of Pharmacogosy 40:188-192.

Hiraoka, K., T. Kodama and Y. Tomita. 1983. In vitro propagation of Bupleurum falcatum. The Japanese Journal of Pharmacogosy 37 :62-67.

Hiraoka, N., N. Yamada, T. Kodama and Y. Tomita. 1984. In viro propagation of Atractylodes lancea. Plant Cell Reports 3:85-87.

Hiraoka, N., N. Yamada, M. Oyanagi and Y. Tomita. 1987. Vegetative propagation of Saposhnikouia divaricata through embryogenesis of leaf callus. The Japanese Journal of Pharmacognosy 41:43-47.

Ichihashi, S. and M. Yamashita. 1977. Studies on the media for orchid seed germination. I. The effects of balances inside each cation and anion group for the germination and seedling development of Bletilla striata seeds. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 45:407-413.

Ichihashi, S. 1978. Studies on the media for orchid seed germination. II . The effects of anion and cation combinations to seedling population and culture periods on the growth of Bletilla striata seeds. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 46:521-529.

Ichihashi, S. 1979. Studies on the media for orchid seed germination. III . The effects of total ionic concentration, cation/ anion ratio, NH4+/ NO3-ratio, and minor elements on the growth of Bletilla striata. New Phytologist 83:121-128.

Ichihashi, S. 1982. Factors affection root formation of Bletilla striata. Japanese Association for Plant Tissue Culture pp. 181-182.

Jonsson, L. and J. E. Nylund. 1979. Favolaschia cdybowskyana (Singer) Singer (Aphyllophorales), a new orchid mycorrhizal fungus from tropical Africa. New Phytologist 83:121-128.

Kaneko, K., N. Yoshida and M. Tanaka. 1986. Studies on the breeding and cultivation of Rhubarb, Rhrum palmatum L. I. The production of the multiple plantlets from "Hokkaidaio" by meristem tip culture. The Japanese Journal of Pharmocognosy 40:401-405.

Kitamura, Y., M. Nakano, H. Miura and M. Sugii. 1987. Root cultures of Swertia pseudochinensis. The Japanese Journal of Pharmacognosy 41:58-60.

Komamine, A., M. Misawa and F. DiCosmo. 1991. Plant Cell Culture in Japan: Progress and Production of Useful Plant Metabolites by Japanese Enterprises Using Plant Cell Culture Technology. CMC Co., Ltd., Tokyo, Japan. pp. 1-162.

Luks, Yu. A. and S. V. Shevchenko. 1977. Seed propagation of terrestrial orchids. Byulleten' Gosudarstvennogo Nikitskogo Botanicheskogo Sada 1:30-35.

Masuhara, G. and K. Katsuya. 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial Orchids. Institute of Scientia Horticulturae 37:331-337.

Matsumoto, M., M. Nagano, Y. Shoyama and I. Nishioka. 1986. New vegetative propagation method of Rehmannia glutinosa. The Japanese Journal of Pharmacognosy 40:193-197.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nagashima, T. 1982. Studies on seed germination and embryogensis in Bletilla striata and Calauthe discolor. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 51:82-93.

Nair, S. R. Fojasingh and S. S. Joshi. 1986. Orchid seed germination and carbohydrate mobilization pattern. Agricultural Research Journal of Kerala 24:128-131.

Namera, A., A. Koyama, N. Fujioka, K. Yamasaki and H. Kohda. 1987. Formation of stigma-like structures and pigments in cultured tissue of Crocus sativus. Japanese Journal of Pharmacognosy 41:260-262.

Namera, A., A. Tanaka, A. Koyama, N. Fujioka, K. Yamasaki and H. Kohda, 1988. Production of pigment in tissue culture of Gardenia jasminoides forma grandiflora. The Japanese Journal of Pharmacognosy 42:252-255.

Nigra, H. M. M. A. Alvarez and A. M. Giulietti, 1989. The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by Solanum eleagnifolium Cav. calli.

Plant Cell Reports 8:230-233.

Nishioka, I. 1988. Clonal multiplication of medicinal plant by tissue culture. The Japanese Journal of Pharmacognosy 42:1-11.

Shoyama, Y., K. Hatano and I. Nishioka. 1983. Clonal multiplication of Pinellia ternata by tissue culture. Plants Medica. 49 :14-16.

Shoyama, Y., N. Hasegawa and I. Nishioko. 1986. Studies on propagation of Fritillaria verticillata by tissue culture. The Japanese Journal of Pharmacognosy 40:198-202.

Shoyama, Y., R. Tareno and I. Nishioko. 1987a. Clonal multiplication of Atractylodes lancea by tip tissue culture. The Japanese Journal of Pharmacognosy 41:313-317.

Shoyama, Y., I. Nishioka, N. Fujioka, H. Kohda and K. Yamasaki. 1987b. Clonal multiplication of Panax japonicus by tissue culture. The Japanese Journal of Pharmacognosy 41:333-337.

Shoyama, Y., N. Hasegawa and I. Nishioko. 1987c. In vitro propagation of Lilium japonicum by culture of bulblet. The Japanese Journal of Pharmacognosy 41:352-355.

Tsay, H. S., T. G. Gau and C. C. Chen. 1989. Repid clonal propagation of Pinellia ternata by tissue culture. Plant cell Reports 8:450-454.

Tsay, H. S., W. D. Chang, C. C. Chen and Y. S. Chang. 1994. The production of medicinal compounds from Angelica dahurica Var. formosona by suspension cell culture. Agric. Assoc. China 168:32-48.

Tsukaba, M., H. Fukui., C. Habara and M. Tabata. 1983. Comparative studies on naphthoquinone derivatives in various crude of "Zicao" (Shikon). The Japanese Journal of Pharmacognosy 37:299-306.

Xu, X. H. and M. R. Davey. 1983. Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and leaf explents of Rehmannia glutinosa. Plant Cell Reports 2:55-57.

Yamada, Y. and Y. Fujita. 1983. Production of useful compounds in culture. In: Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for Propagation and Breeding. Evans, D. D. et al. (eds) Macmillan Publishing Co., New York. pp. 717-728.

Yamamoto, H., A. Kitayama and T. Tomimori. 1985. Root differentiation and paeoniflor

in production in Paeonia lactiflora callus cultures. The Japanese Journal of Pharmacognosy 39:185-189.

Yamamoto, H., N. Cobnyasu, K. Watanabe and T. Tomimori, 1986a. Effects of carbon sources on the growth and flavonoid formation of Scutellaria baicalensis stem callus cultures. Japanese Journal of Pharmacognosy 40:19-25.

Yamamoto, H., N. Cobnyasu, K. Watanabe and T. Tomimori. 1986b. Effects of 5% moltose and callus growth flavonoid formation of some Scutellaria baicalensis stem callus lines. Japanese Journal of Pharmacognosy 40:33-39.

Yamamoto, H., K. Watanabe and T. Tomimori, 1987. Effects of various growth inhibitors on the callus growth and flavonoids production of Scutellaria baicalensis callus cultures. Japanese Journal of Pharmacognosy 41:97-101.

Yoshikawa, T. and T. Furuya, 1987. Saponin production by cultures of Penax ginseng transformed with Agrobacterium rhizogenes. Plant Cell Reports 6:449-453.

Fig. 1-2 Mass propagation of Pinellia ternata through bulbil culture. Bulbil-derived PLB were cultured in 2,4-D free medium for 2 weeks results in plant regeneration (Fig. 1). Multiple shoots were induced from PLB cultured on solid medium containing 2-5 mg/l BA for 2 weeks (Fig. 2).

Fig. 3-4 Mass propagation of Anoectochillus formosanus through alternate solid and liquid-culture method. Healthy plants were obsevered from liquid medium-induced multiple shoots transferred on a solid medium for one month (Fig. 3) and two month (Fig. 4).

Fig. 5 Mass propagation of Rehmannia glutinosa through shoot tip culture.

Fig. 6 Mass propagation of Platycodon grandiflorum through bud culture.

Fig. 7 Mass propagation of Adenophora Triphylla through stem segment culture. Multiple shoots were induced from stem segment cultured in solid medium for two month.

Fig. 8 Mass propagation of Codonopsis radix through stem segment culture. Multiple shoots were induced from stem segment cultured in solid medium for two month.

Fig. 9 Mass propagation of Bupleurum falcatum through shoot tip cultured on a liquid medium.

Fig. 10 Mass propagation of Bletilla formosana through shoot tip cultured.

Fig. 11 Mass propagation of Angelica sinensis through immature embryo culture.

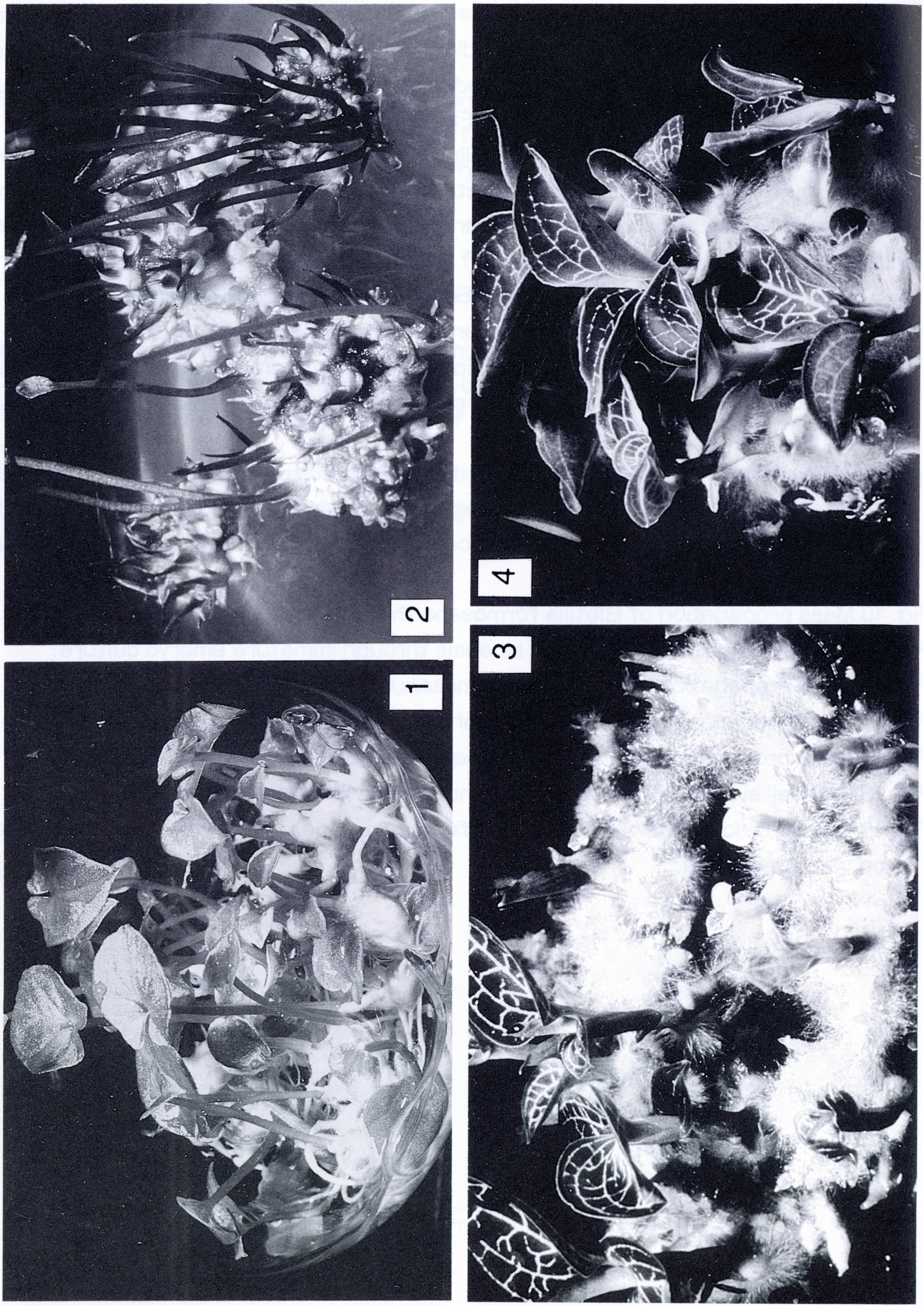
Fig. 12 Mass propagation of Aconitum formosanum through shoot tip culture.

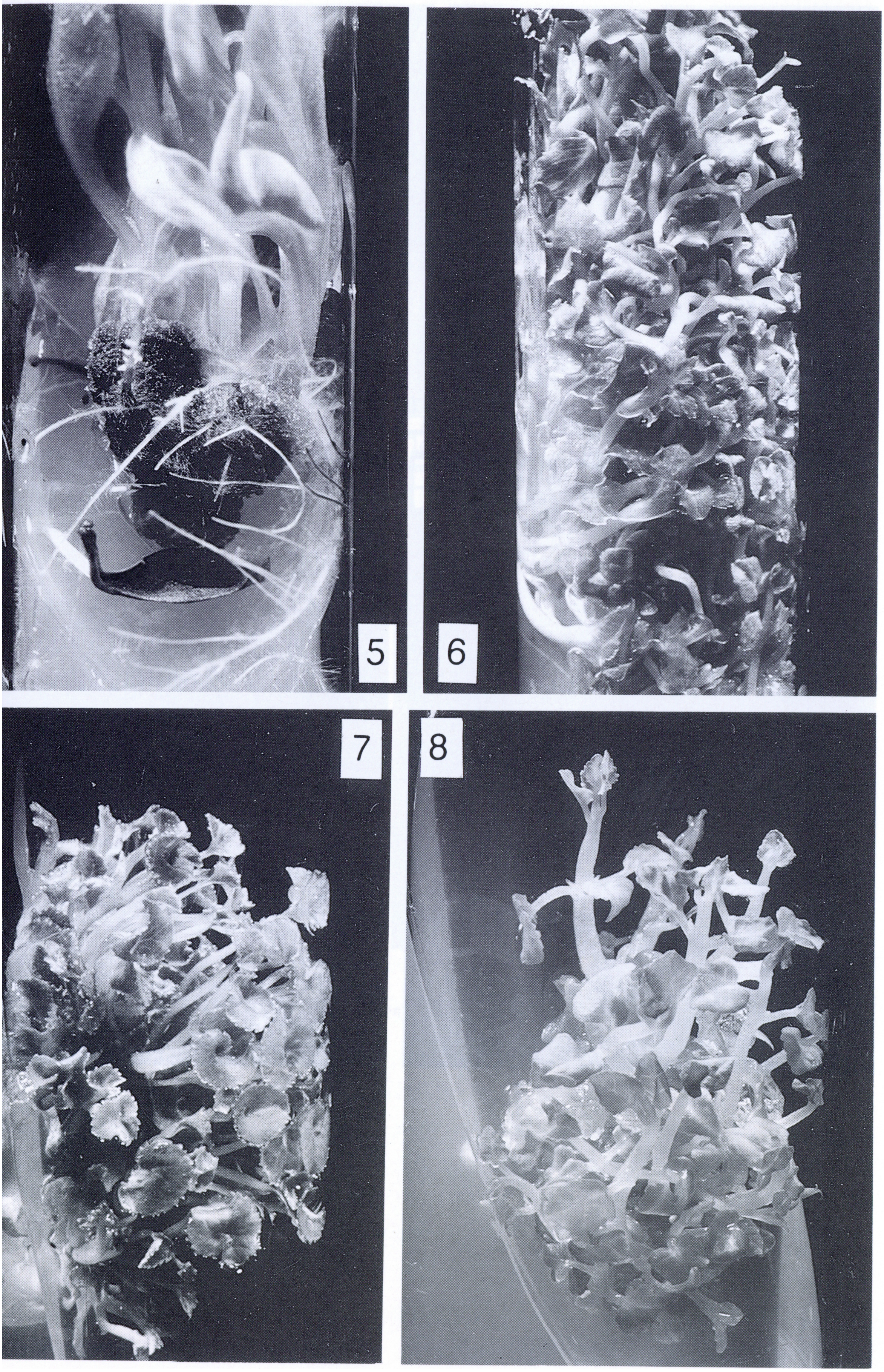
Fig. 13 Mass propagation of Fritillaria hupehensis through bulbscale culture.

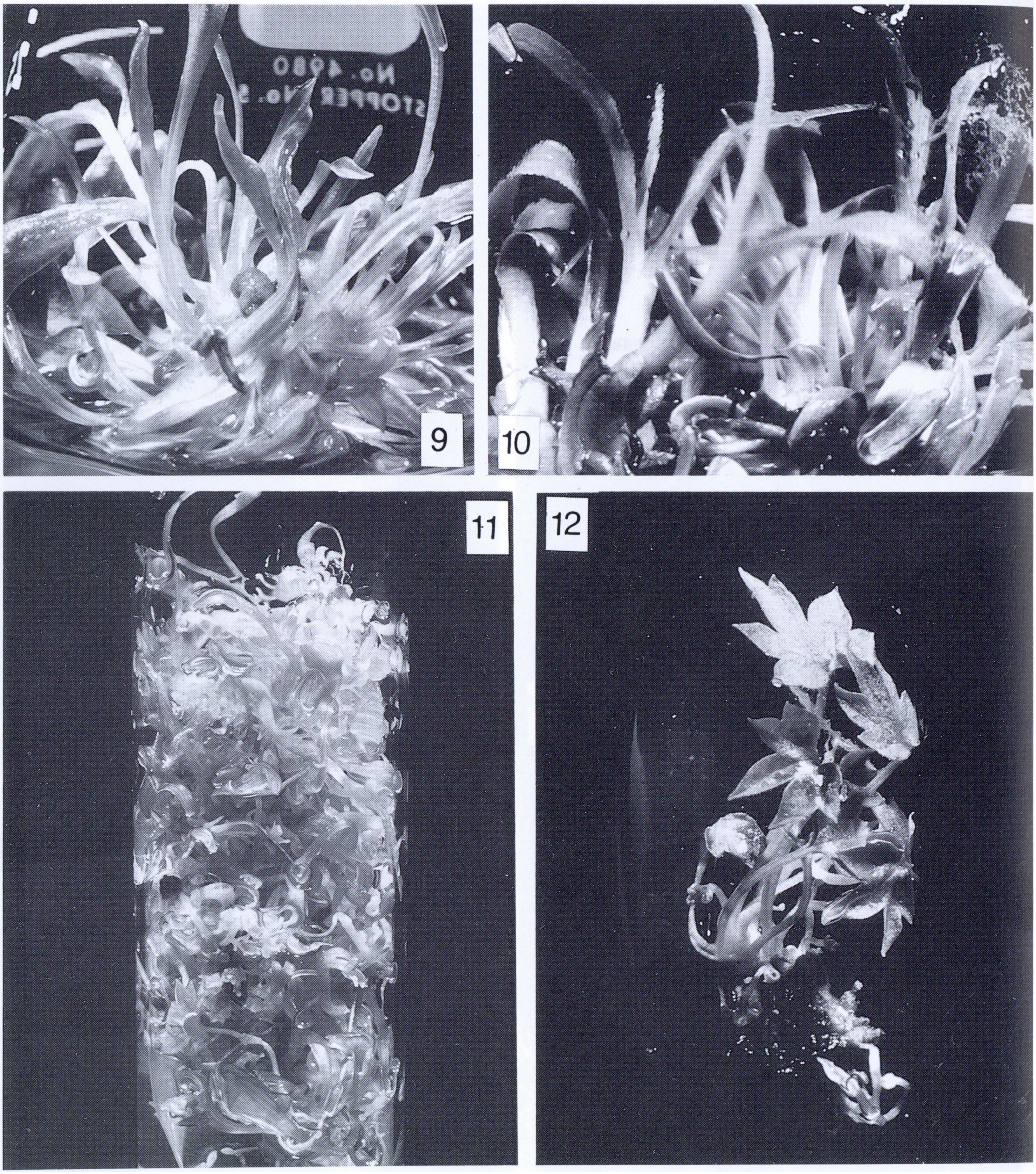
Fig. 14 Mass propagation of Polygonum cuspidatum through shoot tip culture.

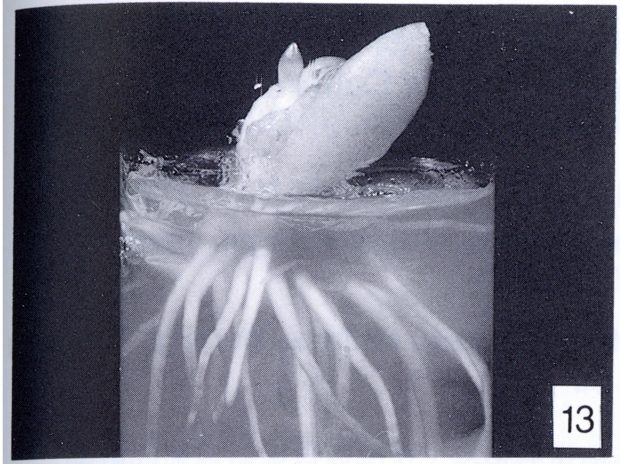
Fig. 15 The cell suspension of Angelica dahurica var formosana.

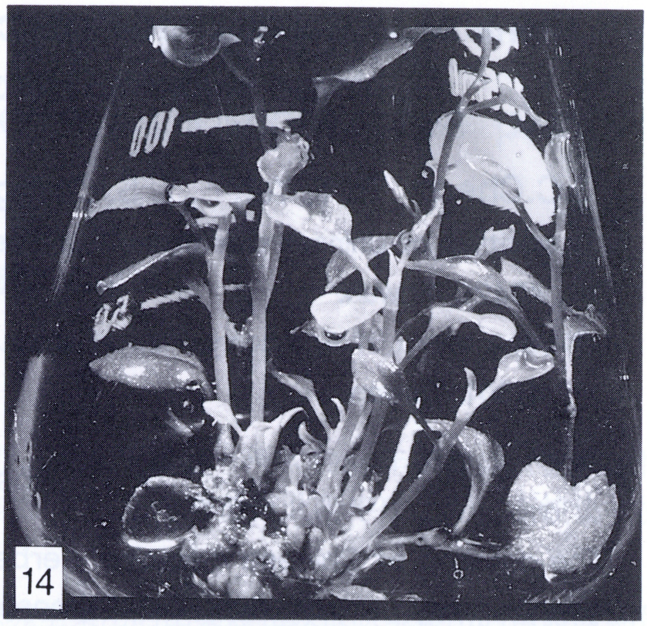
Fig. 16 The method of packed cell volume for measure cell growth of Angelica dahurica var. formosana.

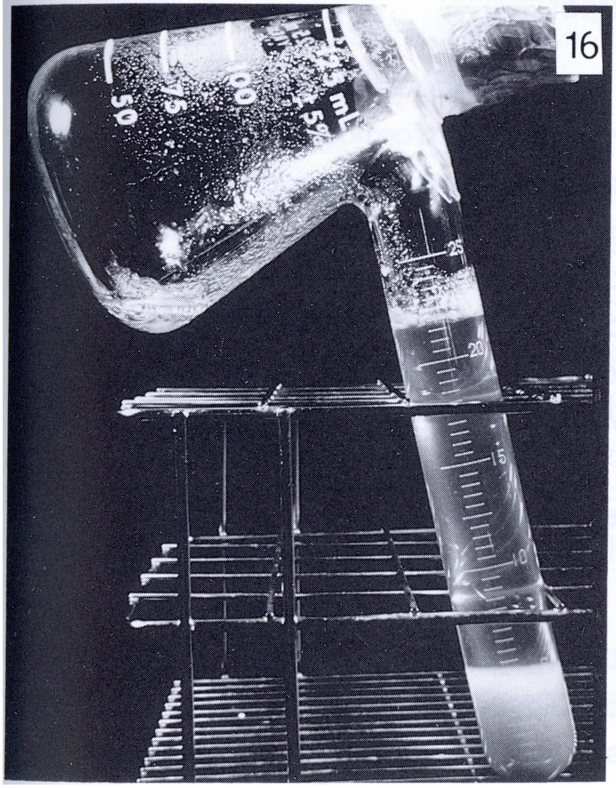

1
2
3
4


5
6
7
8

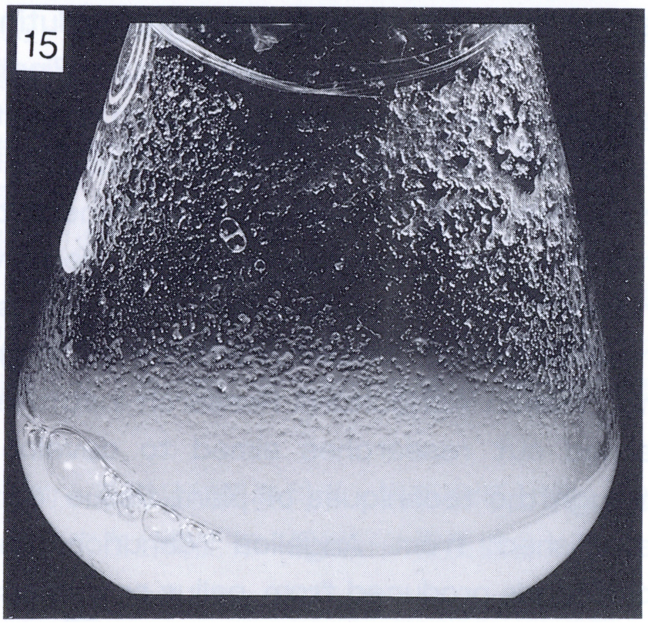

9
10
11
12


13


14



16


15

Clonal Multiplication and Production of Useful Compounds of Chinese Medicinal Herbs by Tissue Culture

C.C.Chen(1), F. T. Yeh(1), Y. S. Chang(1), M. T. Hsieh(1) and H. S. Tsay(2)

(1) Institute of Chinese pharmaceutical Sciences, China Medical College, Taichung 40421, Taiwan.

(2) Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung 41301, Taiwan.

Abstract

The demand of Chinese medicinal herbs such as Angelica sinensis, Adenophora triphylla, Codonopsis radix, Aconitum formosanum, Bletilla formosana, Angelica dahurica, Fritillaria hupehensis, Rehmannia glutinosa, Platycodon grandiflorum, Polygoni multiflori, Anoectochillus formosanus, Pinellia ternata and Bupleurum falcatum has been increasing continuously in both domestic and foreign markets. These medicinal herbs have been used widely for thousands of years to nourish the vital essence and to release body heat, with special benefit to the blood. Recent research has shown that they also possesses analgesic, sedative, expectorant, hapoglycemic, diuretic and laxative effects. Although these plants are indigenous species to Taiwan, they are endangered species now after prolonged and extensive collection. In view of this, Taiwan Agricultural Research Institute and China Medical College have jointly carried out researches aimed to develop resources of Chinese medicial herbs through the techniques of plant tissue culture. Cell suspension cultures were also established from Angelica dahurica and Dioscorea doryophora. The useful compounds produced from callus or suspension cell were isolated and analyzed. The methods established from tissue culture will be valuable for medicinal industry. This paper summarized the results we have obtained from the above-mentioned herbs in the last ten years.

Key words : Medicinal herbs, Tissue culture, Clonal multiplication, Useful compounds.